# 高效氯氟氰菊酯对西方蜜蜂生存能力及记忆相关特性的影响

张　波#, 廖春华#, 胡景华, 吴小波*

(江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045)

**摘要:**【目的】本实验旨在明确3个低浓度高效氯氟氰菊酯对西方蜜蜂 *Apis mellifera* 生存能力与学习记忆的影响,为蜂群的健康养殖及深入研究蜜蜂发生蜂群崩溃失调病(colony collapse disorder, CCD)现象机理提供一定的理论参考。【方法】通过点滴法分别给刚羽化蜜蜂背部点滴不同剂量($1/2\ LD_{50}$, $1/4\ LD_{50}$和$1/8\ LD_{50}$)的高效氯氟氰菊酯(以点滴纯丙酮为溶剂对照),并进行笼养,记录各组蜜蜂每天死亡情况;药物处理后第7天,利用吻伸反应(proboscis extension response, PER)方法测定不同浓度高效氯氟氰菊酯对西方蜜蜂工蜂学习记忆能力的影响。将刚羽化的蜜蜂用不同剂量高效氯氟氰菊酯处理后放入原始蜂群,20 d后采集氯氟氰菊酯处理后的20日龄工蜂,对其定距离放飞归巢能力进行检测,采用实时定量PCR对记忆相关基因谷氨酸受体基因(*GluRA*)和N-甲基-D天冬氨酸受体基因(*Nmdar*1)的相对表达量进行检测。【结果】$1/2\ LD_{50}$组工蜂的平均寿命显著低于$1/4\ LD_{50}$组、$1/8\ LD_{50}$组和对照组($P<0.05$),而后三者之间差异不显著($P>0.05$)。$1/2\ LD_{50}$组工蜂PER成功率也显著低于$1/4\ LD_{50}$组、$1/8\ LD_{50}$组和对照组($P<0.05$),后三者之间差异也不显著($P>0.05$)。$1/8\ LD_{50}$组和对照组蜜蜂在1 000 m处的归巢率显著高于$1/2\ LD_{50}$组和$1/4\ LD_{50}$组($P<0.05$),但$1/2\ LD_{50}$组与$1/4\ LD_{50}$组以及$1/8\ LD_{50}$与对照组之间差异不显著($P>0.05$)。$1/8\ LD_{50}$组和对照组工蜂的*GluRA*基因表达量显著高于$1/2\ LD_{50}$组和$1/4\ LD_{50}$组($P<0.05$),而且$1/4\ LD_{50}$组工蜂的*GluRA*基因表达量也显著高于$1/2\ LD_{50}$组($P<0.05$),但$1/8\ LD_{50}$组与对照组工蜂的*GluRA*基因表达量差异不显著($P>0.05$);$1/4\ LD_{50}$组、$1/8\ LD_{50}$组和对照组工蜂的*Nmdar*1基因相对表达量均显著高于$1/2\ LD_{50}$组($P<0.05$),但前三者之间差异不显著($P>0.05$)。【结论】高效氯氟氰菊酯对西方蜜蜂的生存能力和记忆行为特性具有一定的影响,这种农药的不合理使用可能影响着蜜蜂的健康养殖。

**关键词:** 西方蜜蜂; 蜂群崩溃失调病; 高效氯氟氰菊酯; 生存能力; 归巢率; 学习记忆

**中图分类号:** Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2017)02-0189-08

# Effects of lambda-cyhalothrin on the viability and memory-related traits of the western honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

ZHANG Bo#, LIAO Chun-Hua#, HU Jing-Hua, WU Xiao-Bo* (Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:**【Aim】This study aims to determine the effects of three low doses of lambda-cyhalothrin on the viability, learning and memory of the western honey bee, *Apis mellifera*, so as to provide theoretical reference for healthy breeding of bee colony and further research on the mechanisms of colony collapse disorder (CCD) phenomenon in bees.【Methods】Lambda-cyhalothrin at various doses ($1/2\ LD_{50}$, $1/4\ LD_{50}$ and $1/8\ LD_{50}$) was dripped on the backs of newly emerged bees of *A. mellifera* through the drop method, respectively, and those dripped with pure acetone were treated as the control group. Bees were

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060327); 国家蜂产业技术体系资助项目(CARS-45-kxj12)

作者简介: 张波, 男, 1990年生, 江苏宿迁人, 硕士研究生, 主要从事养蜂学研究, E-mail: 971669722@qq.com; 廖春华, 男, 1992年生, 四川德阳人, 硕士研究生, 主要从事养蜂学研究, E-mail: bees1992@163.com

#共同第一作者 Authors with equal contribution

*通讯作者 Corresponding author, E-mail: wuxiaobo21@163.com

收稿日期 Received: 2016-11-27; 接受日期 Accepted: 2017-01-23

cultured in cages after treatment and the mortality rates in various groups were recorded daily. Effects of various doses of lambda-cyhalothrin on the learning and memory ability of worker bees were determined through proboscis extension response (PER) at 7 d after treatment. The newly emerged bees treated with different doses of lambda-cyhalothrin were put into the original bee colonies, and their homing ability was determined at 20 d after treatment. The relative expression levels of learning and memory related genes including glutamate receptor gene (*GluRA*) and N-methyl-D-aspartate receptor gene (*Nmdar*1) in 20-day-old worker bees were assayed using real-time quantitative PCR. 【Results】The results showed that the average life span of worker bees in the 1/2 $LD_{50}$ group was significantly lower than those in the 1/4 $LD_{50}$ group, the 1/8 $LD_{50}$ group and the control group, while there was no significant difference among the latter three groups. The success rate of PER of worker bees in the 1/2 $LD_{50}$ group was significantly lower than those in the 1/4 $LD_{50}$ group, the 1/8 $LD_{50}$ group and the control group, while there was no significant difference among the latter three groups either ($P>0.05$). The homing rates at 1 000 m in the 1/8 $LD_{50}$ group and the control group were significantly higher than those in the 1/2 $LD_{50}$ and 1/4 $LD_{50}$ groups ($P<0.05$), but there was no significant differences between the 1/2 $LD_{50}$ and 1/4 $LD_{50}$ groups, as well as between the 1/8 $LD_{50}$ group and the control group ($P>0.05$). The relative expression levels of *GluRA* gene in 20-day-old worker bees in the 1/8 $LD_{50}$ group and the control group were significantly higher than those in the 1/2 $LD_{50}$ and 1/4 $LD_{50}$ groups ($P<0.05$), and that in the 1/4 $LD_{50}$ group was also significantly higher than that in the 1/2 $LD_{50}$ group ($P<0.05$), but there was no significant differences between the 1/8 $LD_{50}$ group and the control group ($P>0.05$). The relative expression levels of *Nmdar*1 gene in worker bees in the 1/4 $LD_{50}$ group, the 1/8 $LD_{50}$ group and the control group were significantly higher than that in the 1/2 $LD_{50}$ group ($P<0.05$), but there was no significant difference among the former three groups ($P>0.05$).【Conclusion】Lambda-cyhalothrin has certain effects on the viability and memory and behavior characteristics of *A. mellifera*, and its unreasonable application may affect healthy breeding of bees.

**Key words**: *Apis mellifera*; colony collapse disorder; lambda-cyhalothrin; viability; homing rate; learning and memory

蜜蜂是昆虫纲膜翅目蜜蜂总科的统称,是自然界传粉昆虫中种类最多、数量最大的类群,并为73%的作物进行传粉,对于农业生产和维护生态系统的生物多样性具有重要而深远的意义(李捷等,2007)。然而,自2006年冬季以来,蜂群崩溃失调病(colony collapse disorder, CCD)席卷了美国、法国、瑞典、德国和澳大利亚等国,致使当地蜂农蜂群损失达50% ~90%(苏松坤等, 2007)。蜜蜂种群数量锐减,使一些农作物因授粉不充分而导致产量降低、品质下降、收益受损。CCD症状主要表现为成年工蜂短时间失踪,蜂巢内外无任何尸体,仅剩下蜂王、卵、幼虫以及一些未成年工蜂的现象。诱发CCD现象的因素可能是栖息地退化、环境变化、营养缺乏、农药的亚致死效应以及蜜蜂疾病等(Cox-Foster *et al.*, 2007; Oldroyd, 2007; Higes *et al.*, 2008; Dhruba, 2009; Goulson *et al.*, 2015; Shi and Liu, 2016),但现在还没有明确的答案。而内吸性杀虫剂可能是引起CCD的主要因素之一,杀虫剂的使用会影响蜜蜂的采集能力、生存能力、蜂群群势以及下一代个体发育等(Bailey, 2005; Cresswell and Thompson, 2012; Whitehorn *et al.*, 2012; Rundlöf *et al.*, 2015; Stanley *et al*, 2015)。Frazier在蜂箱内检测到大量杀菌剂、除草剂、杀虫剂(Kaya *et al.*, 2015),这些潜在的毒素相互作用,严重影响蜜蜂健康,即使根据说明书使用,仍然对蜜蜂有亚致死效应。亚致死剂量一直以来受到大家的关注,而且最近的许多研究表明,即使降低亚致死剂量,同样会影响蜜蜂生物学的许多方面,包括行为能力、学习记忆能力、蜂群发展以及病原体的易感性等(Wu *et al.*, 2011; Gill *et al.*, 2012; Pettis *et al.*,2012; Frost *et al.*, 2013; Williamson *et al.*, 2013; Doublet *et al.*, 2015)。

高效氯氟氰菊酯,作为一种广谱杀虫剂,在农作物中广泛使用,比如油菜、杏仁、苹果和樱桃等。蜜蜂在为农作物授粉过程中很可能在它们的采集区域内遭受这种药物的危害,而关于高效氯氟氰菊酯对蜜蜂生存能力的影响报道较少,主要开展了高效氯氟氰菊酯对蜜蜂个体的毒力试验(Thakur *et al.*,

2007；周凌云等，2014）。基于此，本实验通过笼养、吻伸反应（proboscis extension response，PER）和无线射频技术（radio frequency identification technology，RFID technology），并通过基因验证，系统研究高效氯氟氰菊酯对西方蜜蜂生存能力及记忆相关特性的影响，为蜜蜂的健康养殖和深入研究蜜蜂发生 CCD 现象机理提供一定的参考。

## 1　材料与方法

### 1.1　试验动物、试剂及仪器

**1.1.1**　试验动物：试验动物为江西农业大学蜜蜂研究所饲养的西方蜜蜂 *Apis mellifera*。

**1.1.2**　主要试剂：高效氯氟氰菊酯微囊悬浮剂（江苏扬农化工股份有限公司），丙酮（上海焱晨化工实业有限公司，分析纯，纯度 99.5%），RNA 提取试剂盒（北京全式金生物技术有限公司产品），Oligo（dT）（美国英杰生命技术公司合成），dNTP Mixture（2.5 mmol/L，TaKaRa），反转录酶 M-MLV（200 U/μL，TaKaRa），荧光染料 SYBR® Premix Ex Taq™ Ⅱ 和 Rox Reference Dye Ⅱ（Takara）。

**1.1.3**　仪器及器材：生化培养箱(GZ-250-GSI 型，韶关市广智科技设备发展有限公司)，PCR 仪(iQTM2 型，Bio-Rad 公司)，普通离心机(飞鸽 KA-1000 型，上海安亭科学仪器公司)，荧光定量 PCR 仪（ABI7500 型，赛默飞世尔科技有限公司)，核酸蛋白质测定仪（NanoPhotometer™ P300，IMPLEN)，自制小木箱(11 cm×13 cm×15 cm)，GPS 全球定位仪（eTreX Vista HCX），蜜蜂无线射频识别（RFID）记录系统(广州市远望谷信息技术有限公司)。

### 1.2　药物配制

将原药用丙酮溶解配制成标准溶液。根据周凌云等(2014)《4 种拟除虫菊酯类杀虫剂对蜜蜂的毒性和安全性评价》中高效氯氟氰菊酯 $LD_{50}$，分别用丙酮稀释标准溶液至相对应的浓度，使 1.5 μL 药液分别含 1/2 $LD_{50}$，1/4 $LD_{50}$ 和 1/8 $LD_{50}$ 所对应的剂量。

### 1.3　高效氯氟氰菊酯对西方蜜蜂寿命的影响

**1.3.1**　工蜂羽化：选取遗传背景并且群势相同的意大利蜜蜂 *A. m. ligustica* 3 群，隔王控制蜂王产卵。将即将出房的封盖子脾放入恒温恒湿箱中（35℃，相对湿度 75%）羽化。

**1.3.2**　药物处理及死亡统计：收集刚羽化的 1 日龄工蜂，用微量注射器分别在蜜蜂背部点滴 1.5 μL 不同剂量（1/2 $LD_{50}$，1/4 $LD_{50}$ 和 1/8 $LD_{50}$）的高效氯氟氰菊酯（以点滴纯丙酮溶剂为对照组），参照韩旭等（2014）笼养试验方法，将药物处理后的工蜂分别放入大小相同的木质盒子（11 cm×13 cm×15 cm）中进行笼养，每组 200 头左右，每组 3 个重复，并给蜜蜂饲喂 50% 的纯糖水，保证足够的食物。每天记录蜜蜂死亡的数量并及时清除，直到蜜蜂全部死亡，并进行统计分析。

### 1.4　高效氯氟氰菊酯对西方蜜蜂学习记忆的影响

按照 1.3 节中的方法对刚羽化的蜜蜂进行药物处理和笼养。7 d 后，将蜜蜂用冰块进行冷冻处理并固定在 U 型管中，放入恒温恒湿箱（35℃，相对湿度 75%）中饥饿 2 h。之后取出工蜂，剔除状态不佳的工蜂。参照 Letzkus 等（2006）的 PER 实验方法，对蜜蜂进行训练和测试，并对测试结果进行统计分析。

### 1.5　高效氯氟氰菊酯对西方蜜蜂归巢能力的影响

取群势大致相同的意大利蜜蜂 3 群，用恒温恒湿箱羽化蜜蜂，收集刚羽化的 1 日龄工蜂，用微量注射器分别给蜜蜂背部点滴不同浓度的药液 1.5 μL，每群每个浓度 500 头左右，待丙酮挥发后，用不同颜色标记不同浓度高效氯氟氰菊酯处理后的蜜蜂，放入原子脾来源群。20 d 后，从试验蜂群中分别采集不同浓度高效氯氟氰菊酯处理后的 20 日龄工蜂，每群每个浓度组 20 头。参照何旭江（2011）的实验方法给蜜蜂贴电子标签，利用 GPS 全球定位系统在距离蜂巢 1 000 m 处进行精确定位，将带电子标记并采食足够糖水的蜜蜂带至目的进行放飞，利用蜜蜂 RFID 系统对其回巢情况进行记录。参照袁安等（2016）方法分析不同浓度高效氯氟氰菊酯对蜜蜂定距离归巢能力的影响。

### 1.6　高效氯氟氰菊酯对西方蜜蜂记忆相关基因表达水平的影响

**1.6.1**　样品采集：按照 1.5 节中的方法处理并饲养蜜蜂后，分别采集不同浓度高效氯氟氰菊酯处理后的 20 日龄的工蜂样品，放入 -80℃ 冰箱保存，待取 RNA。

**1.6.2**　RNA 提取及反转录：每个实验组取 3 头蜜蜂的头部，在液氮中充分研磨直至成粉末状，参考秦秋红（2013）的实验方法对样本 RNA 进行提取，用核酸蛋白测定仪测定 RNA 的纯度（1.9～2.1 之间符合标准），用琼脂糖凝胶电泳评估 RNA 的 28S，18S 和 5S 3 条带的完整性。用反转录试剂盒对总 RNA 进行反转录，反转录产物保存于 -80℃ 冰箱保存。

**1.6.3 荧光定量 PCR 引物的设计及荧光定量 PCR**：根据 NCBI 中意大利蜜蜂 *Nmdar*1 和 *GluRA* 基因 mRNA 序列,用 Primer5.0 软件设计引物序列(表 1),以甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(*GAPDH*-3)作为内参基因。参照江武军等(2016)荧光定量 PCR 的实验方法,荧光定量 PCR 反应体系(10 μL): cDNA 1 μL, SYBR® Premix ExTaq™ Ⅱ 5 μL, Rox 0.2 μL, 上游和下游引物各 0.4 μL,超纯灭菌水 3 μL,混匀后放入荧光定量 PCR 仪中进行扩增。反应条件: 95℃ 30 s; 95℃ 10 s, 60℃ 1 min, 40 个循环;之后 50℃加热到 90℃(每 6 s 升高 1℃)。建立溶解曲线,收集目的基因与内参基因的 Ct 值(Wang *et al.*, 2014),并参考 Huang 等(2012)的方法计算各个基因的相对表达量。

**表 1 荧光定量引物序列**

**Table 1 Gene-specific primers used in real-time quantitative PCR**

| 基因名称 Gene name | 上游引物(5′-3′) Forward primer | 下游引物(5′-3′) Reverse primer |
|---|---|---|
| *GluRA* | ACTCTGTTCGTCTGTGGGGTG | TTCGTTAGAAGGGCAGCGTA |
| *Nmdar*1 | GTATTTCCGTCGCCAAGTC | TGTAAACCAATCCCATAGCCA |
| *GAPDH*-3 | GCTGGTTTCATCGATGGTTT | ACGATTTCGACCACCGTAAC |

## 1.7 数据分析

采用 SPSS 17.0 软件中 Kaplan-Meier 对生存曲线进行分析,并用 SPSS 中的“ANOVA and *t*-test”中的“ANOVA”对实验数据进行单因素方差统计分析。

# 2 结果

## 2.1 高效氯氟氰菊酯对西方蜜蜂工蜂寿命的影响

由表 2 可知,1/2 $LD_{50}$组工蜂的平均寿命显著低于 1/4 $LD_{50}$组、1/8 $LD_{50}$组和对照组($P<0.05$),但后三者之间差异不显著($P>0.05$)。分析工蜂存活曲线发现,高剂量农药处理组(1/2 $LD_{50}$组)工蜂的生存时间明显低于其他实验组,而且 1/2 $LD_{50}$组工蜂存活率明显低于其他组,1/2 $LD_{50}$组工蜂大部分在15日龄前死亡,而其他组工蜂大部分在20日龄前后死亡(图 1)。

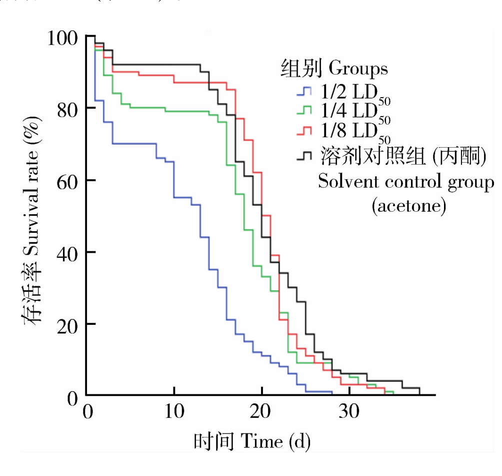



图 1 高效氯氟氰菊酯对西方蜜蜂工蜂生存能力的影响

Fig. 1 Effects of lambda-cyfluthrin on the survival of *Apis mellifera* worker bees

**表 2 不同浓度高效氯氟氰菊酯对西方蜜蜂工蜂平均寿命的影响**

**Table 2 Effects of lambda-cyfluthrin on the average lifespan of *Apis mellifera* worker bees**

| 组别 Groups | 平均寿命(d) Mean longevity | 中位数 Median | 样品数 Sample size |
|---|---|---|---|
| 1/2 $LD_{50}$ | 12.018 ± 0.467 b | 14 | 598 |
| 1/4 $LD_{50}$ | 18.370 ± 0.451 a | 19 | 610 |
| 1/8 $LD_{50}$ | 19.242 ± 0.363 a | 20 | 668 |
| 溶剂对照组(丙酮) Solvent control group (acetone) | 20.244 ± 0.378 a | 20 | 641 |

同列数据(平均值 ± 标准误)后标不同字母表示差异显著(Log-rank 检验, $P<0.05$)。Values (mean ± *SE*) in the same column with different letters are significantly different (Log-rank test, $P<0.05$).

## 2.2 高效氯氟氰菊酯对西方蜜蜂学习记忆能力的影响

结果如图 2 所示,1/2 $LD_{50}$组 PER 成功率显著低于 1/4 $LD_{50}$组、1/8 $LD_{50}$组和对照组($P<0.05$),但后三者之间差异不显著($P>0.05$)。

## 2.3 高效氯氟氰菊酯对西方蜜蜂工蜂归巢能力的影响

结果如图 3 所示,1/8 $LD_{50}$组和对照组的蜜蜂在 1 000 m 处的归巢率显著高于 1/2 $LD_{50}$组和 1/4 $LD_{50}$组($P<0.05$),但 1/2 $LD_{50}$组与 1/4 $LD_{50}$组以及

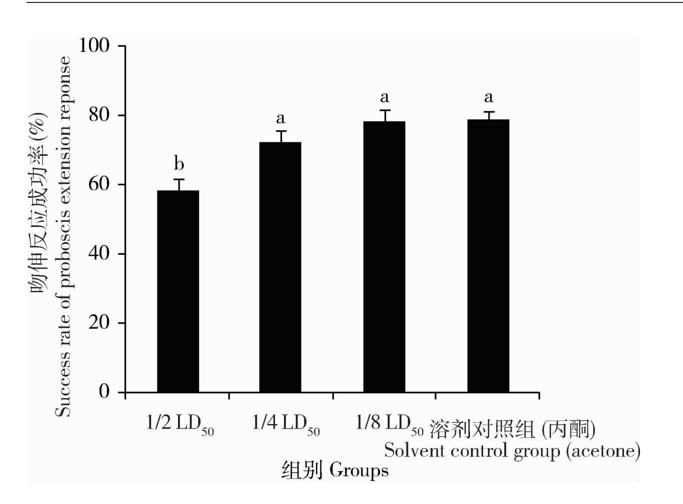



图 2　不同浓度高效氯氟氰菊酯对西方蜜蜂工蜂学习记忆能力的影响

Fig. 2　Effects of different concentrations of lambda-cyfluthrin on learning memory abilities of *Apis mellifera* worker bees

数据为平均值 ± 标准误，柱上标注不同字母表示差异显著（方差分析，$P < 0.05$）；下图同。Data are means ± *SE*, and different letters above bars mean significant difference (ANOVA test, $P < 0.05$). The same for the following figures.

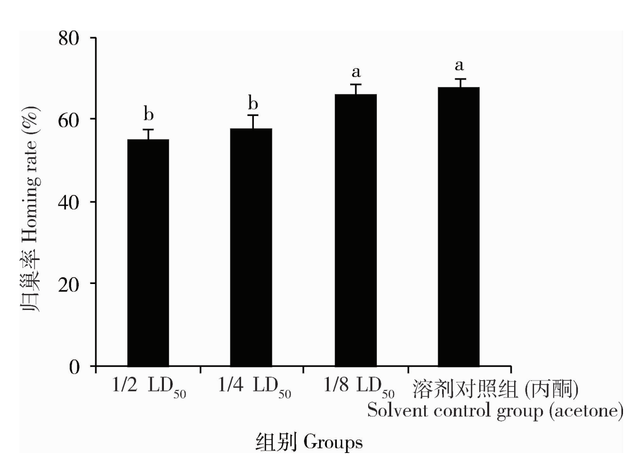



图 3　不同浓度高效氯氟氰菊酯对西方蜜蜂工蜂归巢能力的影响

Fig. 3　Effects of different concentrations of lambda-cyfluthrin on the homing rate of *Apis mellifera* worker bees

1/8 $LD_{50}$组与对照组之间差异不显著($P > 0.05$)。

## 2.4　高效氯氟氰菊酯对西方蜜蜂工蜂学习记忆相关基因表达量的影响

由图 4 可知，1/8 $LD_{50}$组和对照组工蜂的 *GluRA* 基因相对表达量显著高于 1/2 $LD_{50}$组和 1/4 $LD_{50}$组($P < 0.05$)，而且 1/4 $LD_{50}$组工蜂的 *GluRA* 基因表达量也显著高于 1/2 $LD_{50}$组($P < 0.05$)，但 1/8 $LD_{50}$组与对照组工蜂的 *GluRA* 基因相对表达量差异不显著($P > 0.05$)；1/4 $LD_{50}$组、1/8 $LD_{50}$组和对照组工蜂的 *Nmdar*1 基因相对表达水平显著高于 1/2 $LD_{50}$组($P < 0.05$)，但前三者之间差异不显著($P > 0.05$)。

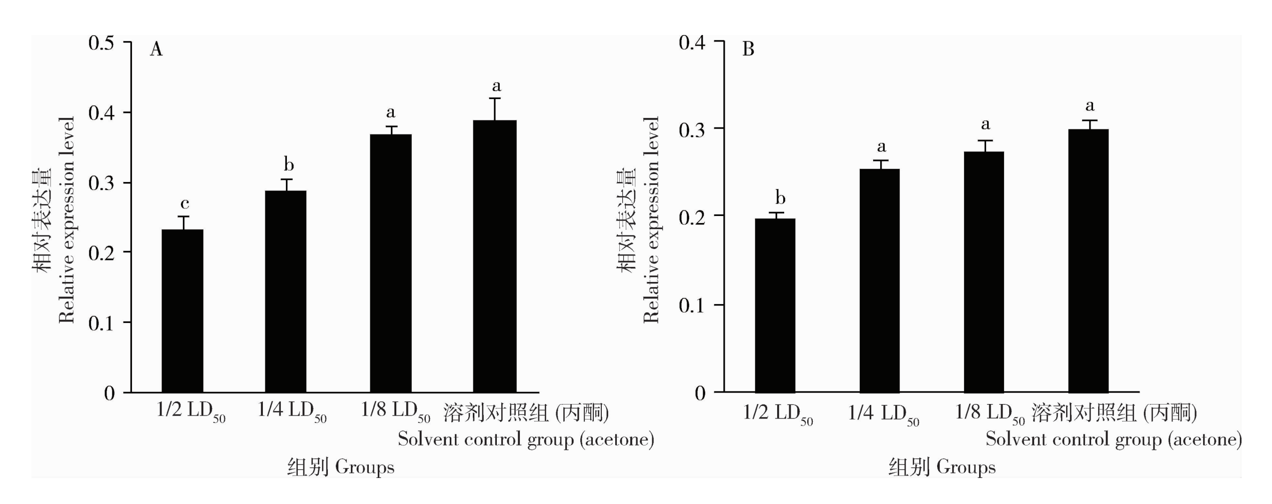



图 4　不同浓度高效氯氟氰菊酯对西方蜜蜂工蜂学习记忆相关基因 *GluRA* (A)和 *Nmdar*1 (B)相对表达量的影响

Fig. 4　Effects of different concentrations of lambda-cyfluthrin on the relative expression levels of learning memory related genes *GluRA* (A) and *Nmdar*1 (B) of *Apis mellifera* worker bees

# 3　讨论

群势强是获取蜂产品高产的基础，而维持强群需要 2 个基本要素，即蜜蜂繁殖快和工蜂寿命长(李位三, 2012)。杀虫剂等农药的广泛使用，经常导致蜜蜂中毒事件的发生，其亚致死浓度或剂量也严重威胁着蜂群的健康，特别是工蜂寿命、行为能力

及免疫力等。本实验发现,即使低于亚致死剂量,高效氯氟氰菊酯在一定的程度上对工蜂寿命产生影响;其中,给蜜蜂点滴 1/2 $LD_{50}$ 剂量的高效氯氟氰菊酯,其寿命显著低于其他低剂量组和对照组,而其他低剂量组的工蜂寿命与对照组差异不显著。这说明就蜜蜂寿命而言,蜜蜂个体所能承受的剂量不超过 1/2 $LD_{50}$。

蜜蜂出巢试飞以及采集花蜜、花粉后的归巢能力与蜜蜂的学习记忆能力密切相关,嗅觉与视觉学习行为能力直接关系到蜜蜂的采集效率(Ramirezromero *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2010)。研究发现,农药会对蜜蜂的嗅觉敏感性、学习能力,运动和认知能力产生消极影响(Bortolotti *et al.*, 2003; Decourtye *et al.*, 2005; Ei-Hassani *et al.*, 2005, 2008; Allouane *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2011)。本研究发现,高效氯氟氰菊酯对蜜蜂的嗅觉学习记忆能力存在一定的影响,研究结果与寿命结果趋势一致,即给蜜蜂点滴 1/2 $LD_{50}$ 剂量的高效氯氟氰菊酯,其嗅觉学习记忆能力显著低于其他低剂量组和对照组。主要原因在于高效氯氟氰菊酯可能与其他药物一样作用于钠离子电压门控通道,并与几个分子靶标相互作用,损害蜜蜂生理过程和认知功能,导致神经功能性障碍(Sattelle and Yamamoto, 1988; Soderlund and Bloomquist, 1989; Zlotkin, 1999; Grünewald *et al.*, 2004),从而影响蜜蜂对新环境的认知能力和联想学习能力,使其嗅觉学习能力降低。当蜜蜂接触高效氯氟氰菊酯剂量不多时,蜜蜂可能通过自身免疫加于抵抗,尚未出现明显的记忆能力下降的现象。另外,蜜蜂归巢能力实验结果基本与高效氯氟氰菊酯对蜜蜂学习记忆能力试验结果一致,不同的是,给蜜蜂点滴 1/4 $LD_{50}$ 剂量的高效氯氟氰菊酯后,其归巢能力也明显低于 1/8 $LD_{50}$ 剂量和对照组,但与点滴 1/2 $LD_{50}$ 剂量高效氯氟氰菊酯组差异不显著,主要原因在于蜜蜂归巢时需要高频率地振动翅膀进行飞翔,这需要消耗大量的体力和能量,这也说明 1/4 $LD_{50}$ 剂量的高效氯氟氰菊酯组会显著影响蜜蜂的体能,从而导致蜜蜂的生存能力下降。

西方蜜蜂的 N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartic acid receptor)基因 *Nmdar*1 和促代谢性谷氨酸受体(glutamate receptor)基因 *GluRA* 被认为是参与西方蜜蜂学习记忆的重要基因(袁安等, 2016)。其中 GluRA 与膜内 G-蛋白偶联,使受体被激活,通过 G-蛋白效应酶、脑内第二信使等组成的信号转到系统起作用,产生缓慢的生理反应,参与学习记忆(Kucharski *et al.*, 2007)。Nmdar 受体是中枢神经系统内的重要兴奋性氨基酸受体之一,为离子型受体,是学习与记忆过程中重要的一类受体(陈福俊等, 2003; Zachepilo *et al.*, 2008)。本结果发现,给蜜蜂点滴高效氯氟氰菊酯 1/2 $LD_{50}$ 剂量组工蜂 *Nmdar*1 和 *GluRA* 基因相对表达量显著低于其他低剂量组和对照组,主要原因在于 1/2 $LD_{50}$ 剂量的高效氯氟氰菊酯已经严重影响着蜜蜂的神经系统等,导致相关基因的表达下降,从而降低了蜜蜂学习记忆能力和归巢能力。另外,给蜜蜂点滴 1/4 $LD_{50}$ 剂量组工蜂的 *GluRA* 基因相对表达量也显著低于 1/8 $LD_{50}$ 剂量组和对照组,但 1/4 $LD_{50}$ 剂量组工蜂的 *Nmdar*1 基因相对表达量与 1/8 $LD_{50}$ 剂量组和对照组差异不显著,可能是 *GluRA* 基因和 *Nmdar*1 基因表达调控机制不同,如对外界影响因素的阈值不同,具体机理有待于进一步探索与分析。

## 参考文献(References)


Allouane Y, Ei-Hassani AK, Gary V, Armengaud C, Lambin M, Gauthier M, 2009. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environ. Toxicol. Chem.*, 28(1): 113-122.

Bailey J, 2005. Contact and oral toxicity to honey bees (*Apis mellifera*) of agents registered for use for sweet corn insect control in Ontario, Canada. *Apidologie*, 36(4): 623-633.

Bortolotti L, Montanari R, Marcelino J, Medrzycki P, Maini S, Porrini C, 2003. Effect of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. *Bull. Insectol.*, 56(1): 63-67.

Chen FJ, He DF, Zhou SC, 2003. D-serine, a new modulator of NMDA receptor. *China Journal of Neuroscience*, 19(2): 127-129. [陈福俊, 何德富, 周绍慈, 2003. D-Ser-NMDA 受体的新调控因子. 中国神经科学杂志, 19(2): 127-129]

Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, VanEngelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WI, 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318(5848): 283-287.

Cresswell JE, Thompson HM, 2012. Comment on "A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees". *Science*, 336(336): 348-350.

Decourtye A, Devillers J, Genecque E, Le MK, Budzinski H, Cluzeau S, Phamdelègue MH, 2005. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 48(2): 242-250.

Dhruba N, 2009. Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biol. Conserv.*, 142(10): 2369-2372.

Doublet V, Labarussias M, Miranda JRD, Moritz RFA, Paxton RJ, 2015. Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environ. Entomol*., 17(4): 969–983.

Ei-Hassani AK, Dacher M, Gary V, Lambin M, Gauthier M, Armengaud C, 2008. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol*., 54(4): 653–661.

Ei-Hassani AK, Dacher M, Gauthier M, Armengaud C, 2005. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacol. Biochem. Behav*., 82(1): 30–39.

Frost EH, Shutler D, Hillier NK, 2013. Effects of fluvalinate on honey bee learning, memory, responsiveness to sucrose, and survival. *J. Exp. Biol*., 216(15): 2931–2938.

Gill RJ, Ramosrodriguez O, Raine NE, 2012. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature*, 491(7422): 105–108.

Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL, 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229): 1255957.

Grünewald B, Wersing A, Wüstenberg DG, 2004. Learning channels. Cellular physiology of odor processing neurons within the honeybee brain. *Acta Biol. Hung*., 55(55): 53–63.

Han X, Tian LQ, Wang ZL, Yan WY, Zeng ZJ, Wu XB, 2014. Effects of vitamin C on development of larvae and viability of worker bees for *Apis cerana cerana*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 26(5): 1265–1271. [韩旭，田柳青，王子龙，颜伟玉，曾志将，吴小波，2014. 维生素 C 对中华蜜蜂幼虫发育及工蜂生存能力的影响. 动物营养学报，26(5): 1265–1271]

He XJ, 2011. The Application of RFID Technique in Honeybees and Contradistinction of Learning and Memory between *Apis cerana cerana* and *Apis melifera ligustica*. MSc Thesis, Jiangxi Agricultural University, Nanchang. [何旭江，2011. 蜜蜂 RFID 技术及中蜂与意蜂学习记忆比较. 南昌：江西农业大学硕士学位论文]

Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, Bailón EG, González-Porto AV, Barrios L, Del Nozal MJ, Bernal JL, Jiménez JJ, Palencia PG, 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol*., 10(10): 2659–2669.

Huang Q, Kryger P, Conte YL, Moritz RFA, 2012. Survival and immune response of drones of a *Nosemosis* tolerant honey bee strain towards *N. ceranae* infections. *J. Invertebr. Pathol*., 109(3): 297–302.

Jiang WJ, He XJ, Wang ZL, Yan WY, Zeng ZJ, Wu XB, 2016. Cloning and expression analysis of cytochrome CYP9E2 gene in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*. *Acta Entomologica Sinica*, 59(10): 1050–1057. [江武军，何旭江，王子龙，颜伟玉，曾志将，吴小波，2016. 中华蜜蜂细胞色素 CYP9E2 基因克隆及其表达分析. 昆虫学报，59(10): 1050–1057]

Kaya M, Erdogan S, Mol A, Baran T, 2015. Comparison of chitin structures isolated from seven Orthoptera species. *Int. J. Biol. Macromil*., 72: 797–805.

Kucharski R, Mitri C, Grau Y, Maleszka R, 2007. Characterization of a metabotropic glutamate receptor in the honeybee (*Apis mellifera*): implications for memory formation. *Invert. Neurosci*., 7: 99–108.

Letzkus P, Ribi WA, Wood JT, Zhu H, Zhang SW, Srinivasan MV, 2006. Lateralization of olfaction in the honeybee *Apis mellifera*. *Curr. Biol*., 16(14): 1471–1476.

Li J, Zhu CD, Wang FH, Huang GY, Zhang YZ, Ding L, Huang HR, 2007. Current research on the status of wild bees and their pollination roles. *Biodiversity Science*, 15(6): 687–692. [李捷，朱朝东，王凤鹤，黄敦元，张彦周，丁亮，黄海荣，2007. 野生蜜蜂及其传粉作用的研究现状. 生物多样性，15(6): 687–692]

Li WS, 2012. Extend the life of the theory and practice. *Journal of Bee*, 32(8): 9–12. [李位三，2012. 延长蜜蜂寿命的理论和实践. 蜜蜂杂志，32(8): 9–12]

Oldroyd BP, 2007. What's killing American honey bees? *PLoS Biol*., 5(6): e168.

Peng H, Niu CY, Lei CL, Cui JJ, Desneux N, 2010. Use of an innovative T-tube maze assay and the proboscis extension response assay to assess sublethal effects of GM products and pesticides on learning capacity of the honey bee *Apis mellifera* L. *Ecotoxicology*, 19(8): 1612–1619.

Pettis JS, Vanengelsdorp D, Johnson J, Dively G, 2012. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Sci. Nat*., 99(2): 153–158.

Qin QH, 2013. Comparion of Learning and Memory of *Apis cerana* and *Apis mellifera* and Analysis of Related Molecular Mechanism of Learning and Memory in Honeybee. MSc Thesis, Jiangxi Agricultural University, Nanchang. [秦秋红，2013. 东方蜜蜂与西方蜜蜂学习记忆比较及蜜蜂学习记忆相关分子机理分析. 南昌：江西农业大学硕士学位论文]

Ramirezromero R, Chaufaux J, Phamdelègue M, 2005. Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. *Apidologie*, 36(9): 601–611.

Rundlöf M, Andersson GK, Bommarco R, Fries I, Hederström V, Herbertsson L, Jonsson O, Klatt BK, Pedersen TR, Yourstone J, 2015. Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature*, 521(7550): 77–80.

Sattelle DB, Yamamoto D, 1988. Molecular targets of pyrethroid insecticides. *Adv. Insect. Physiol*., 20: 147–213.

Shi R, Liu F, 2016. Quantum chemical study on the stability of honeybee queen pheromone against atmospheric factors. *J. Mol. Model*., 22(6): 1–13.

Soderlund DM, Bloomquist JR, 1989. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annu. Rev. Entomol*., 34: 77–96.

Stanley DA, Garratt MPD, Wickens JB, Wickens VJ, Potts SG, Raine NE, 2015. Neonicotinoid pesticide exposure impairs crop pollination services provided by bumblebees. *Nature*, 528(7583): 548–550.

Su SK, Zhan Y, Cai F, Liu F, Chen SL, 2007. Advances on colony collapse disorder (CCD) of honeybee. *Apiculture of China*, 58(11): 5–7. [苏松坤，湛毅，蔡芳，刘芳，陈盛禄，2007. 蜂群

崩溃失调病(CCD)研究进展. 中国蜂业, 58(11): 5-7]

Thakur SS, Karnatak AK, Maurya RP, Karnatak DC, 2007. Toxicity of deltamethrin and lambdacyhalothrin to *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) at different exposure periods. *J. Entomol. Res.*, 31(1): 43-45.

Wang WX, Tian LQ, Huang Q, Wu XB, Zeng ZJ, 2014. Effects of 10-hydroxy-2-decenoic acid on the development of honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *J. Apicult. Res.*, 53(1): 171-176.

Whitehorn PR, O'Connor S, Wackers FL, Goulson D, 2012. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*, 336(6079): 351-352.

Williamson SM, Baker DD, Wright GA, 2013. Acute exposure to a sublethal dose of imidacloprid and coumaphos enhances olfactory learning and memory in the honeybee *Apis mellifera*. *Invert. Neurosci.*, 13(1): 63-70.

Wu JY, Anelli CM, Sheppard WS, 2011. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLoS ONE*, 6(2): e14720.

Yuan A, Guo YH, Wu XB, Huang X, Liao CH, 2016. Effects of dietary protein levels on the homing capability and memory related gene expression of *Apis mellifera ligustica*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 28(1): 296-302. [袁安, 郭亚惠, 吴小波, 黄晓, 廖春华, 2016. 饲粮蛋白质水平对意大利蜜蜂归巢能力及记忆相关基因表达的影响. 动物营养学报, 28(1): 296-302]

Zachepilo TG, Il'Inykh YF, Lopatina NG, Molotkov DA, Popov AV, Savvateevapopova EV, Vaido AI, Chesnokova EG, 2008. Comparative analysis of the locations of the NR1 and NR2 NMDA receptor subunits in honeybee (*Apis mellifera*) and fruit fly (*Drosophila melanogaster*, Canton-S wild-type) cerebral ganglia. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 38(4): 369-372.

Zhou LY, Zhang L, Wei YY, 2014. Study of toxicity and safety evaluation on four pyrethroid insecticides to honeybee (*Apis mellifera* L.). *Resource Development & Market*, 30(6): 641-643. [周凌云, 张莉, 魏芸芸, 2014. 4 种拟除虫菊酯类杀虫剂对蜜蜂的毒性和安全性评价. 资源开发与市场, 30(6): 641-643]

Zhou T, Zhou W, Wang Q, Dai PL, Liu F, Zhang YL, Sun JH, 2011. Effects of pyrethroids on neuronal excitability of adult honeybees *Apis mellifera*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 100(1): 35-40.

Zlotkin E, 1999. The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annu. Rev. Entomol.*, 44: 429-455.

(责任编辑: 赵利辉)